

(10)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-66307

(P2001-66307A)

(43)公開日 平成13年3月16日 (2001.3.16)

(51)Int.Cl'  
G 01 N 33/53  
33/92

識別記号

F I  
G 01 N 33/53  
33/92テーコード(参考)  
W 2 G 0 4 8  
Z

## 審査請求 未請求 請求項の数 4 OL (全 5 頁)

(21)出願番号

特願平11-244440

(22)出願日

平成11年8月31日 (1999.8.31)

(71)出願人 000141875

株式会社いかがく  
京都府京都市伏見区羽束鈴古川町328番地

(72)発明者 内田 審夫

京都府京都市伏見区羽束鈴古川町328番地  
株式会社いかがく内

(73)発明者 真策 新一

京都府京都市伏見区羽束鈴古川町328番地  
株式会社いかがく内

(74)代理人 100086318

弁理士 楠島 三雄 (外2名)

Pターム(参考) A01J 4/025 B852 C425 C426  
D462 D463 D464 D465 D466

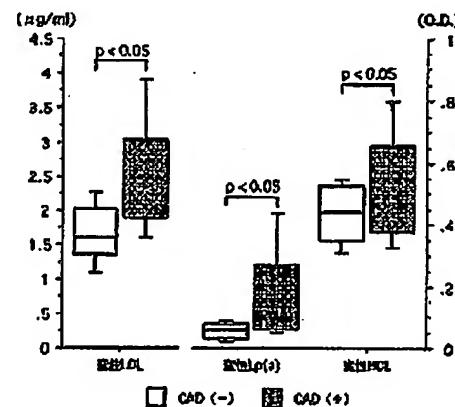
F031 F033 F036 F037

## (54)【発明の名称】 血液中の変性リボ蛋白の検出方法

## (57)【要約】

【課題】 動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展と深く関わる、呑摂変性リボ蛋白の新規な検出方法を提供する。

【解決手段】 LDL, HDL, VLDL, Lp(a), LDL (small, dense LDL) などのリボ蛋白が変性されてなる呑摂変性リボ蛋白と、他の血清蛋白との複合体を測定対象にして血液中の変性リボ蛋白を検出する。



冠動脈硬化症における血中の変性 (LDL, Lp(a), HDL) 量

(2) 特開2001-66307

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】低比重リボ蛋白(LDL)、高比重リボ蛋白(HDL)、超低比重リボ蛋白(VLDL)、中間型リボ蛋白(IDL)、Lp(a)、小型かつ高密度のLDL(small, dense LDL)などのリボ蛋白が変性されてなる各種変性リボ蛋白と、他の血漿蛋白との複合体を測定対象にする血液中の変性リボ蛋白の検出方法。

【請求項2】 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、フィブリノーゲン又はフィブリシン(各々の分解産物を含む)、IgAもしくはフィブロネクチンと各種変性リボ蛋白との複合体を測定対象とする請求項1に記載の変性リボ蛋白の検出方法。

【請求項3】酵素免疫法、ラテックス凝集法、免疫発光分析法、イムノクロマト法などの免疫学的測定法を用いる請求項1または2に記載の変性リボ蛋白の検出方法。

【請求項4】固相抗体として抗ヒト $\alpha$ 1-アンチトリプシン/リボ蛋白複合体中の $\alpha$ 1-アンチトリプシンを特異的に認識する抗体、抗ヒトフィブロネクチン/リボ蛋白複合体中のフィブロネクチンを特異的に認識する抗体、抗ヒトIgA/リボ蛋白複合体中のIgAを特異的に認識する抗体もしくは、抗ヒトフィブリノーゲン抗体を用い、標識抗体には測定対象に応じて酵素をはじめとする標識物質を標識した抗ヒトapo B 100抗体、抗ヒトapo A 1抗体、抗ヒトapo E抗体、抗ヒトLp(a)抗体、抗ヒトapo G抗体、抗ヒトapo B 48抗体などの免疫反応検出試薬を用いる請求項2ないし3に記載の変性リボ蛋白の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、血液中に存在するLDL、HDL、VLDL、IDL、Lp(a)、Small, dense LDLなどのリボ蛋白の変性(特に酸化変性)リボ蛋白が $\alpha$ 1-アンチトリプシン、フィブリノーゲン又はフィブリシン(各々の分解産物を含む)、IgAもしくはフィブロネクチンと複合体を形成して存在することを見出すとともに、この点に着目した新規な変性リボ蛋白の検出方法に関するもので、動脈硬化性病変やアルツハイマー病などの早期診断や治療上での薬効評価などに寄与せんとするものである。

## 【0002】

【発明が解決しようとする課題】動脈硬化症は大動脈、冠状動脈、脳動脈および頸動脈に多く発生し、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。また、最近ではアルツハイマー病も動脈硬化症と関係性の大きい疾患であることがわかつってきた。従来、血液中で、これらの生体内での動脈硬化症の状態を直接反映する測定対象がなく、血液中あるいは血漿中のLDL、Lp(a)、レムカントリボ蛋白、Small, dense LDL、酸化LDLなど、LDLを主体とした血管壁脂質蓄積と関わりの深い、動脈硬化性病変に関わるリボ蛋白として測定されてきた。なかんず

2

く、酸化LDLと粥状動脈硬化病変の進展との関連性がスタイルンバーグ(Steinberg, D. et al. Engl. Med. 320: 915, 1989)により、一方、Rossらが発唱した傷害反応仮説(Ross, R. Nature. 362: 801, 1993)によって指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化LDLの関与が注目されてきた。

【0003】しかし、最近の研究では酸化HDLのみならず酸化HDL(Nakajima, T et al. Biochem Biophys Biophys Res Commun. 217: 407, 1995)が動脈硬化症部に局在する卒業、大村らは(大村寛政、他、動脈硬化、25: No.4, 126, 1997)冠動脈硬化症において、血清HDL中の過酸化脂質が増大しているのを認め、動脈硬化の形成にHDLの酸化変性も関与していることを報告している。同様に、鈴東らは(鈴東昌見、他、動脈硬化、24: 327, 1996)動脈内膜に酸化等による変性Lp(a)が沈着しているのを認め、Lp(a)の動脈硬化進展様序に変性Lp(a)の関与の可能性を示唆している。また最近の疫学調査では、アルツハイマー病の発症の背景には動脈硬化があることが指摘されており(Kalaria, RN. Pharmacol &

Ther. 72: 193, 1996)、リボ蛋白の酸化変性やapoEの表現型と動脈硬化症やアルツハイマー病の発症との関連が注目されている(Prem Kumar, DRD. et al. Am J Pathol. 148: 2083, 1996)。

【0004】即ち、活性酸素によりLDLが酸化修飾されてヘパリン結合能を失い、難溶性の沈殿を形成することによって脂質過酸化物が血管や神経組織に蓄積し、細胞を傷害することが予想されている(平村和行、他、Jpn J Electroph. 42: 27, 1998)。最近までは、動脈硬化の発症進展に関する、LDLに関する生化学的、分子生物学的研究の進歩が大きく、酸化LDLがatherogenicityの主役であることが強調されすぎているきらいがある。しかし、近年の研究の成果として、上述のごとく動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展への関与物質として、LDLのみでなく、HDL、Lp(a)、VLDLなど多種の酸化変性リボ蛋白が含まれることが明らかとなつた。

【0005】さらに、各リボ蛋白の酸化変性に大きな差があり、HDL、Lp(a)、Small, dense LDLは酸化され易く、粒子径の大きなLDLやVLDLは酸化されにくい特性を有することもわかつてき。また、LDLに分類されるsmall, dense LDLは糖尿病患者に多く出現するLDLであり、動脈硬化症全てを反映できないことも明らかとなつた。そこで、LDLのみならず、特に被酸化性の強いHDLやLp(a)の酸化変性体にも注目する必要が生じてきた。

【0006】しかし、現状ではこれら各種リボ蛋白の変性体を血中で安易に測定する方法が存在しなかつた。したがつて、本研究は、動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展と深く関わる、各種変性リボ蛋白の新規な検出方法を提供することを課題とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】生体の主要な構成成分と

(3)

特開2001-86307

3

して蛋白質、脂質、糖質、核酸があげられるが、最も酸化されやすいのは脂質であり、酸素添加反応が起り、いわゆる過酸化脂質が生成する。脂質が酸化されやすいのは多くの脂質がリノール酸やアラキドン酸のような高不飽和脂肪酸のエステルとなっているためである。リボ蛋白は脂質と蛋白質から構成されており、リボ蛋白が酸化された場合には、脂質、蛋白質共に酸化変性を受ける。この生体脂質が非酵素的に酸化される引き金としては、活性酸素が考えられている。この過酸化脂質の測定は順相HPLC法などの分析化学的手法が用いられ、健常人の生体内でも確実に脂質の非酵素的酸化が起きていることが証明されている（山本順寛、他、蛋白質・核酸・酵素、44: 1253, 1999）。

【0008】上述のごとく現状では、血液中の総過酸化脂質量の把握は可能であるが、リボ蛋白個別の酸化変性度を知る方法は現在のところ存在せず、LDLの酸化変性体が血液中に存在することの実証は、本発明者らの特願平8-317162号による方法によって初めて成された。さらに本発明者は、特願平11-109001号、特願平11-207913号に開示した手法によっても血液中の酸化変性LDLの検出が可能であることを発見した。

【0009】そして、その後、更なる研究と検討を繰り返した結果、循環血液中にLDL以外のリボ蛋白の酸化変性体が存在する事実を発見して本発明に至った。即ち、特願平8-317162号、特願平11-109001号および、特願平11-207913号の手法を発展させて、血液中の各個リボ蛋白の変性体を個別に測定可能な検出方法を確立して本発明を完成させたものである。

【0010】より具体的に説明すると、本発明は、各種リボ蛋白（カイロミクロン、VLDL、IDL、LDL、Lp(a)、HDL）が酸化変性を受けると血漿蛋白（特に $\alpha$ 1-アンチトリプシンやフィブリノーゲン又はフィブリリン（呑の分解産物を含む）、IgA、フィブロネクチンなど）と複合体を形成し、且つ、いずれの複合体も動脈硬化症疾患と関連性が高い点を見出して完成されたものである。

【0011】なお典型的には、本発明は、各個酸化変性リボ蛋白と $\alpha$ 1-アンチトリプシンの複合体を特異的に認識する抗体、呑酸化変性リボ蛋白とIgAの複合体を認識する特異抗体、各個酸化変性リボ蛋白とフィブロネクチンの複合体を認識する特異抗体、もしくは、抗ヒトフィブリノーゲン抗体を固相抗体として用い、呑リボ蛋白の酸化変性体と反応させた後に、酵素をはじめとする標識物をラベルした各リボ蛋白を構成するアボ蛋白に対する抗体を反応させて、血液中の酸化変性リボ蛋白を分別測定する検出方法である。

【0012】この場合、血液中のリボ蛋白を超速心法や化学物質を用いた沈降法で分離したものを試料とすることも、血漿や血清をそのまま試料として測定することも可能である。リボ蛋白を分離して試料とする場合は、固相抗体として抗ヒトIgA、抗ヒト $\alpha$ 1-アンチトリプシン

4

ン、抗ヒトフィブロネクチン抗体が使える。この検出方法によれば、生体内でフリーラジカル追跡酸化反応が進行している状況を、各リボ蛋白の被酸化の状態として（HDL、Lp(a)、Small、dense LDLは特に易酸化性である）把握することが可能となる。また、この検出の臨床応用としては、動脈硬化症やアルツハイマー病の早期診断や、動脈硬化症治療薬投与時の薬効評価などに好適である。

【0013】

10. 【実施例】以下、本発明について具体的に説明する。  
【血清中あるいは血漿中の変性LDL/ $\alpha$ 1-アンチトリプシン複合体の測定】
  1. IgG-O-AT-4モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20 $\mu$ g/mlで溶解し、マイクロプレートに100 $\mu$ l/wellで分注する。
  2. 4°C下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1%シラヌと牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100 $\mu$ l/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4°Cで乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水25 $\mu$ l/wellで3回洗浄する。
  3. マイクロプレートに55 $\mu$ g/ml Mouse Gamma GlobulinとRabbit Gamma Globulin台有1%BSA溶液を100 $\mu$ l/well 1分注し、これに血清あるいは標準液を50 $\mu$ l添加する。
  4. 室温下一晩反応させる。
  5. 0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。
  6. ピオチン標識Fab' (IgG-apoB-427をモノクローナル抗体を1%BSA容達で1.6 $\mu$ g/mlとし、100 $\mu$ l/well文注する。
  7. 37°C下1.5時間反応させる。
  8. 3. と同様、0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。
  9. HRP標識アビシンD (Vector Laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 $\mu$ l/well分注する。
  10. 37°C下30分間反応させる。
  11. 3. と同様、0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。
  12. 発色試薬を100 $\mu$ l/well分注し、室温下30分間反応させる。
  13. 1Mリン酸水溶液を100 $\mu$ l/well分注し、反応を停止する。
  14. 主波長450nm、副波長520nmで測光する。
  15. 人工的に調整した変性LDL/ $\alpha$ 1-アンチトリプシン複合体により求めた換算係数から試料中の変性LDL/ $\alpha$ 1-アンチトリプシン複合体濃度を算出する。
16. 【血清中あるいは血漿中の変性Lp(a)/ $\alpha$ 1-アンチトリプシン複合体の測定】
  1. IgG-O-AT-4モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20 $\mu$ g/mlで溶解し、マイク

## (4) 特開2001-66307

5

ロプレートに100μl/wellで分注する。

- 4°C下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1%シラ精と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100μl/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4°Cで乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250μl/wellで3回洗浄する。
- マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとRabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100μl/well1分注し、これに血清あるいは標準液を50μl添加する。
- 室温下一晩反応させる。
- 0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- ビオチン標識Fab'化IgG-Lp (a) ポリクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6μg/mlとし、100μl/well分注する。
- 37°C下1.5時間反応させる。
3. と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- HRP標識アビシンD (Vector Laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100μl/well分注する。
- 37°C下30分間反応させる。
3. と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- 発色試薬を100μl/well分注し、室温下30分間反応させる。
- 1Mリン酸水溶液を100μl/well分注し、反応を停止する。
- 主波長450nm、副波長620nmで測光する。
- 人工的に調整した変性Lp (a) / α1-アンチトリプシン複合体により求めた検量線から試料中の変性Lp (a) / α1-アンチトリプシン複合体濃度を算出する。

【0015】〔血清中あるいは血漿中の変性HDL/α1-アンチトリプシン複合体の測定〕

- IgG-G-AT-4モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20μg/mlで溶解し、マイクロプレートに100μl/wellで分注する。
- 4°C下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1%シラ精と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100μl/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4°Cで乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250μl/wellで3回洗浄する。
- マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとRabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100μl/well1分注し、これに血清あるいは標準液を50μl添加する。
- 室温下一晩反応させる。
- 0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- ビオチン標識Fab'化IgG-αpEポリクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6μg/mlとし、100μl/well分注する。
- 37°C下1.5時間反応させる。
3. と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- HRP標識アビシンD (Vector Laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100μl/well分注する。
- 37°C下30分間反応させる。
3. と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- 発色試薬を100μl/well分注し、室温下30分間反応させる。

6

を1%BSA溶液で1.6μg/mlとし、100μl/well分注する。

- 37°C下1.5時間反応させる。
3. と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- HRP標識アビシンD (Vector Laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100μl/well分注する。
- 37°C下30分間反応させる。
3. と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- 発色試薬を100μl/well分注し、室温下30分間反応させる。
- 1Mリン酸水溶液を100μl/well分注し、反応を停止する。
- 主波長450nm、副波長620nmで測光する。
- 人工的に調整した変性HDL/α1-アンチトリプシン複合体により求めた検量線から試料中の変性HDL/α1-アンチトリプシン複合体濃度を算出する。

【0016】〔血清中あるいは血漿中の変性VLDL/α1-アンチトリプシン複合体の測定〕

- IgG-O-AT-4モノクローナル抗体を0.05M Tris-HCl、0.15M NaCl pH8.0緩衝液に20μg/mlで溶解し、マイクロプレートに100μl/wellで分注する。
- 4°C下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、0.1%シラ精と牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を100μl/wellで分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し4°Cで乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水250μl/wellで3回洗浄する。
- マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとRabbit Gamma Globulin含有1%BSA溶液を100μl/well1分注し、これに血清あるいは標準液を50μl添加する。
- 室温下一晩反応させる。
- 0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- ビオチン標識Fab'化IgG-αpEポリクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6μg/mlとし、100μl/well分注する。
- 37°C下1.5時間反応させる。
3. と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- HRP標識アビシンD (Vector Laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100μl/well分注する。
- 37°C下30分間反応させる。
3. と同様、0.005%Tween20溶液250μl/wellで3回洗浄する。
- 発色試薬を100μl/well分注し、室温下30分間反応させる。

(5)

特開2001-66307

8

7

13.  $1\mu\text{L}$ リン酸水溶液を $100\mu\text{l}/\text{well}$ 分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 人工的に調整した変性VLDL/ $\alpha$ 1-アンチトリプシン複合体により求めた検査値から試料中の変性VLDL/ $\alpha$ 1-アンチトリプシン複合体濃度を算出する。

【0017】[血清中の変性LDL/フィブリノーゲンまたはフィブリン(各々の分解産物を含む)複合体の測定]

1. IgG-フィブリノーゲンポリクローナル抗体を $0.05\text{M}$  Tris-HCl,  $0.15\text{M}$  NaCl pH8.0緩衝液に $20\mu\text{g}/\text{ml}$ で溶解し、マイクロプレートに $100\mu\text{l}/\text{well}$ で分注する。

2.  $4^\circ\text{C}$ 下で一晩物理吸着後、蒸留水で3回洗浄し、 $0.1\%$ シタ醇と牛血清アルブミン、 $0.05\%$ アジ化ナトリウムを含む $0.05\text{M}$  pH7.5で調整したTris-HCl緩衝液を $100\mu\text{l}/\text{well}$ で分注し室温で30分以上静置した後、液を廃棄し $4^\circ\text{C}$ で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを蒸留水 $250\mu\text{l}/\text{well}$ で3回洗浄する。

3. マイクロプレートに $55\mu\text{g}/\text{ml}$  Mouse Gamma Globulin と Rabbit Gamma Globulin 合有 $1\%\text{BSA}$ 溶液を $100\mu\text{l}/\text{well}$ 分注し、これに血清あるいは標準液を $50\mu\text{l}$ 添加する。

4. 室温下一晩反応させる。

5.  $0.005\%$  Tween20溶液 $250\mu\text{l}/\text{well}$ で3回洗浄する。

6. ピオチン標識Fab'化IgG-apoB-427モノクローナル抗体を $1\%\text{BSA}$ 溶液で $1.6\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、 $100\mu\text{l}/\text{well}$ 分注する。

7.  $37^\circ\text{C}$ 下1.5時間反応させる。

8. 3. と同様、 $0.005\%$  Tween20溶液 $250\mu\text{l}/\text{well}$ で3回洗浄する。

9. HRP標識アビシンD (Vector Laboratories社製) を $1\%\text{カゼイン}$ 溶液で15000倍希釈とし、 $100\mu\text{l}/\text{well}$ 分注 \*

\*する。

10.  $37^\circ\text{C}$ 下30分間反応させる。

11. 3. と同様、 $0.005\%$  Tween20溶液 $250\mu\text{l}/\text{well}$ で3回洗浄する。

12. 発色試薬を $100\mu\text{l}/\text{well}$ 分注し、室温下30分間反応させる。

13.  $1\mu\text{L}$ リン酸水溶液を $100\mu\text{l}/\text{well}$ 分注し、反応を停止する。

14. 主波長450nm、副波長620nmで測光する。

15. 人工的に調整した変性LDL/フィブリノーゲン複合体により求めた検査値から試料中の変性LDL/フィブリノーゲンまたはフィブリン(各々の分解産物を含む)複合体濃度を算出する。

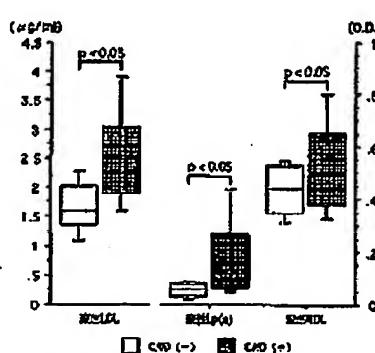
【0018】[血清中の変性Lp(a)、変性HDL/フィブリノーゲンまたはフィブリン複合体の測定] 上述と同様にピオチン標識Fab'化抗体にLp(a)抗体、apoAI抗体を用いればよい。

【0019】[冠動脈疾患における血中変性(LDL, Lp(a), HDL)濃度] 冠動脈造影検査により、1segmentに5%以上の有意狭窄病変を有するものを冠動脈硬化症と定め、これに基づき冠動脈硬化症と診断された者、CAD (+) 群 ( $n=26$ )、基準値以下のCAD (-) 群 ( $n=21$ )を対象に変性(LDL)およびLp(a) /  $\alpha$ 1-アンチトリプシン複合体、変性HDL/ $\alpha$ 1-アンチトリプシン複合体を測定し、比較的検討したところ、いずれの変性リボ蛋白についてもCAD (+) 群が有意な高値を示した(図1)。

【図面の簡単な説明】

【図1】冠動脈硬化症における血中の変性リボ蛋白(LDL, Lp(a), HDL)の濃度を図示したものである。

[図1]



冠動脈硬化症における血中の変性(LDL, Lp(a), HDL)濃度

**METHOD FOR DETECTING DENATURED LIPOPROTEIN IN BLOOD**

**Publication number:** JP2001066307 (A) **Also published as:**  
**Publication date:** 2001-03-16  JP3491743 (B2)  
**Inventor(s):** UCHIDA KAZUO; MASHIBA SHINICHI +  
**Applicant(s):** IKAGAKU KK +  
**Classification:**  
- **international:** G01N33/53; G01N33/92; G01N33/53; G01N33/92; (IPC1-7): G01N33/53  
- **European:**  
**Application number:** JP19990244440 19990831  
**Priority number(s):** JP19990244440 19990831

**Abstract of JP 2001066307 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To detect various type denatured lipoprotein related to a crisis and an extension of an arteriosclerosis by adopting a composite of each of various type denatured lipoproteins and another plasma protein as an object to be measured. **SOLUTION:** In this method for detecting a denatured lipoprotein in blood, a specific antibody for recognizing composites of each of various type denatured lipoprotein and a plasma protein or particularly an  $\alpha$ -antitrypsin, IgA, or fibronectin or an antihuman fibrinogen antibody is reacted with an oxidation denatured material of each lipoprotein as a solid phase antibody. After the reaction, the antibody is reacted with an apoprotein for constituting the lipoprotein labeled with a labeled material such as an enzyme or the like, and the oxidation denatured lipoprotein in the blood is fractionally measured.; If the lipoprotein in the blood is fractionated to a sample, an antihuman IgA, an antihuman  $\alpha$  1-antitrypsin, or an antifibronectin antibody is used as a solid phase antibody. Thus, the state that a free radical chain oxidation reaction is advanced in vivo can be grasped as a state of being oxidized of each lipoprotein, and is adapted to an early diagnosis of an arteriosclerosis or an Alzheimer's disease.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide